

Estudos sobre a tuberculose

PELO

Dr. A. Fontes,

Assistente.

(Com as estampas 16 e 17.)

Studien ueber Tuberculose

VON

Dr. A. Fontes,

Assistenten am Institute.

(Hierzu Tafeln 16 und 17.)

SUMARIO : — Interesse do estudo das granulações do bacilo de KOCH. — Orientação para esse estudo. — Diferença de forma, volume e numero entre as granulações. — Reações colorantes : GRAM, GIEMSA, DELAFIELD, HEIDENHAIN e ROSEBUSCH. — Coloração pelo LUGOL. — Coloração vital. — Função da granulação no bacilo. — Citologia do bacilo. — Filtração do puz tuberculoso. — Verificação das granulações no puz filtrado em véla BERKEFELD. — Substancia tuberculijena. — Reação do organismo infetado. — Natureza quimica da granulação. — Precipitação dos sais soluveis de calcio *in vitro* sob a forma de fosfatos. — Desaparecimento das granulações em virtude dessa reação. — Bacilo-caseina de AUCLAIR e PARIS e granulação do bacilo. — Transmissão de tuberculose em serie por inoculação de granulações. — Tuberculose latente. — Conclusões. — Bibliografia.

O interesse do estudo das granulações do bacilo de KOCH sobressae de varios fatos que se verificam por observação dellas.

A grande rezistencia que essas granulações apresentam ás cauzas de destruição do bacilo, a constancia de sua prezença no

INHALTSÜBERSICHT : — Bedeutung des Studiums der Granulationen des KOCH'schen Bacillus. — Gesichtspunkte für dieses Studium. — Unterschied der verschiedenen Granula nach Form, Grösse und Zahl. — Färbereactionen : GRAM, GIEMSA, DELAFIELD, HEIDENHAIN und ROSEBUSCH. — Färbung mit Lugolscher Lösung. — Vitale Färbung. — Funktionen der Granula in den Bazillen. — Cytologie der Bazillen. — Filtration des tuberculösen Eiters. — Nachweis der Granula im Eiter nach Filtration durch BERKEFELD'sche Filter. — Tuberkel-erzeugende Substanz. — Reaktion des inficirten Organismus. — Chemische Natur der Granula. — Precipitation *in vitro* der löslichen Kalksalze unter der Form von Phosphaten. — Verschwinden der Granula in Folge dieser Reaktion. — Bacillocasein von AUCLAIR und PARIS und die Granulation der Bazillen. — Uebertragung der Tuberculose in Serien durch Einimpfung der Granula. — Latente Tuberculose. — Schlussfolgerungen. — Bibliographie.

Die Bedeutung des Studiums der Granula in den KOCH'schen Bazillen erhellt aus verschiedenen Tatsachen, die man bei ihrer Beobachtung erkennt.

Die bedeutende Resistenz dieser Granula gegen bazillenerstörende Einflüsse, ihr beständiges Vorkommen in tuberculösem

material de natureza tuberculosa, onde mesmo não se encontram bacilos inteiros, a variabilidade do numero, da forma e do volume são fatos que justificam estudo um pouco mais cuidadoso da natureza dessas granulações. Ainda mais: essas granulações variam em volume, em forma e em numero não só nos bacilos da tuberculose como nos para-tuberculosos, no da lepra e em geral nas estreptotriqueas. E' variavel ainda a disposição que ocupam no bacilo da tuberculose (central, excentrica, polar, bipolar). No estudo comparativo dessas granulações com as dos acido-resistentes comuns e as do bacilo de HANSEN observámos que diferenças mais notaveis existem entre as granulações do bacilo da tuberculose e as do bacilo da lepra, que entre estas e as acido-resistentes. Pelo menos entre as amostras estudadas a estrutura do bacilo de HANSEN se aproxima mais da estrutura do da pseudo-tuberculose BINOT que da do bacilo da tuberculose verdadeira.

E' assim que os bacilos da lepra córados pelo metodo que anteriormente aconselhei (1908 e 1909) se apresentam quasi que em sua totalidade córados exclusivamente pelo cristal-violeta que impregnou todo o corpo do bacilo; em numero muito menor apresentam-se bacilos granulares com espaços claros entre as granulações. A razão desse fenomeno atribue-se ao estado de morte da maioria dos bacilos nos lepromas. Inferre-se daí ainda que a perda da alcool-resistencia foi oriġinada pela hidrólize das substancias de natureza graxa existentes no bacilo, como succede com os bacilos de KOCH no puz tuberculoso e que é determinada pela *tuberculo-cirase*, fermento que encontrámos no puz tuberculoso e cuja natureza determinámos em trabalhos anteriores (1908 e 1909). Esse mesmo fermento foi encontrado tambem no puz tuberculoso por BERGEL (1909) que estudou a sua ação sobre a cêra das abelhas, e recentemente FIESSINGER e PIERRE MARIE (1909) confirmaram esses trabalhos e sem que delles tivessem conhecimento, reconhecendo por outro caminho a existencia

Material, in welchem sich keine ganzen Bazillen finden, ihr Schwanken in Zahl, Form und Grösse sind Umstände, welche ein etwas sorgfältigeres Studium der Natur dieser Granulationen rechtfertigen. Ueberdies findet sich ein solcher Wechsel in Grösse, Form und Zahl nicht nur bei den Tuberkelbazillen, sondern auch bei den paratuberculösen, bei denen der Lepra und im Allgemeinen bei den *Streptotrichen*. Auch die Lagerung im Tuberkelbazillus wechselt; sie kann central, excentrisch, polar oder bipolar sein.

Beim Vergleiche dieser Granula mit denjenigen der gewöhnlichen säurefesten und des HANSEN'schen Bazillus beobachteten wir auffallendere Unterschiede in den Körnern des Tuberkel- und Leprabazillus, als zwischen diesem und den säurefesten. Wenigstens in den untersuchten Proben näherte sich die Struktur des HANSEN'schen Bazillus mehr derjenigen des Bazillus der Pseudotuberculose von BINOT, als derjenigen des ächten Leprabazillus.

So sieht man, dass bei Färbung nach der von mir 1908 und 1909 empfohlenen Methode, die Leprabazillen fast alle ausschliesslich die Farbe des Krystallviolett zeigen, welche den ganzen Bazillenkörper durchtränkt hat; in weit geringerer Zahl zeigen sich körnige Bazillen mit hellen Zwischenräumen zwischen den Granulationen. Die Ursache dieser Erscheinung sucht man darin, dass die Bazillen der Leprome zum grössten Teile abgestorben sind. Man schliesst daraus, dass der Verlust der Alkoholresistenz durch die Hydrolyse der im Bazillus vorhandenen fetthaltigen Substanzen entsteht, wie es bei den KOCH'schen Bazillen im tuberculösen Eiter der Fall ist, wo sie durch die *Tuberculo-cirase* bewirkt wird; dieses Ferment habe ich im tuberculösen Eiter aufgefunden und seine Natur in einer früheren Arbeit festgestellt. (1908 und 1909). Auch BERGEL fand dieses Ferment im tuberculösen Eiter und studierte seine Einwirkung auf Bienenwachs; neuerdings bestätigten auch FIESSINGER und PIERRE MARIE diese Arbeiten, ohne sie zu kennen,

nos linfócitos de fermento saponificador da cêra das abelhas.

Na lepra a analogia prevê que se observe o mesmo fenomeno que na tuberculose, tanto mais quanto resulta da observação de MAC-LEOD (1909) que nos lepromas os bacilos de HANSEN em sua maioria se acham mortos.

Nas lezões tuberculosas, entretanto, e mesmo nas culturas, na maioria senão quizi na totalidade, os bacilos quando perdem a alcool-rezistencia, apresentam sómente as granulações córadas em violeta e separadas por espaços claros, ao contrario do que sucede na maioria dos bacilos nos lepromas e nas pseudo-tuberculosas (amostras BINOT, MOELLER, FICKER e TOBLER). O bacilo da tuberculose só se apresenta intensamente córado em violeta nas formas de dejeneração muito acentuada quando existem em lezões tuberculosas ou nas formas muito novas quando examinadas em culturas.

Isto resulta não só do volume das granulações como do estado de condensação em que se acha no interior dos bacilos a substancia que as constitue e da forma que ellas apresentam apoz a fixação e coloração. Sempre granulares, esfericas na tuberculose, mostram-se redondas, ovoides ou levemente angulares na lepra e nos acidorezistentes. Nas formas actinomicoticas da tuberculose vêm-se granulações em forma de clava ou ovoides.

Na tuberculose as granulações exercem função essencial á vida do bacilo. A variabilidade do seu numero e volume, não só em relação aos outros bacilos como ao proprio em que estão incluídas, da sua colocação no interior dos bacilos (bipolar, central, levemente afastadas do eixo do bacilo), e a existencia de granulações em liberdade nas culturas homojeneas, apresentando uma orla de substancia que se mostra alcool-rezistente, a auzencia de granulações limitadas aos bacilos, ainda que raros, que tomam o GRAM intensa-

indem sie auf anderem Wege in den Lymphocyten das Vorkommen eines Bienenwachs verseifenden Fermentes erkannten.

Bei der Lepra kann man in analoger Weise das Vorkommen derselben Erscheinung erwarten, um so mehr, als aus den Beobachtungen von MAC-LEOD (1909) hervorgeht, dass in den Lepromen die HANSEN'schen Bazillen der Mehrzahl nach abgestorben sind.

Dagegen zeigen in den tuberculösen Läsionen und besonders in den Kulturen die meisten oder nahezu alle Bazillen, wenn sie die Alkoholresistenz verlieren, die Granula violett gefärbt und durch helle Zwischenräume getrennt, im Gegensatz zu dem, was in meisten Bazillen bei Lepromen und Pseudotuberculose der Fall ist (Bazillienstämme von BINOT, MOELLER, FICKER und TOBLER). Der Tuberkelbazillus zeigt eine intensive Violettfärbung in tuberculösen Läsionen nur bei sehr ausgesprochenen Degenerationsformen und in Kulturen nur bei sehr jungen Formen.

Es geht dies nicht nur aus dem Volumen der Granula hervor, sondern auch aus dem Zustande der Verdichtung, in welchem die sie bildende Substanz im Innern der Bazillen vorkommt und der Form, welche sie nach Fixierung und Färbung zeigen. Bei der Tuberculose immer körnig und rund, zeigen sie sich bei Lepra- und säurefesten Bazillen rund, länglich oder leicht eckig. Bei den aktinomykotischen Formen der Tuberculose zeigen die Granula eine Keulen- oder Eiform.

Bei der Tuberculose haben die Granula eine für das Leben des Bazillus wesentliche Funktion. Ihre Veränderlichkeit in Zahl und Grösse, nicht nur den anderen Bazillen gegenüber, sondern auch in Beziehung zu dem Bazillus, welcher sie einschliesst, und ihrer Lagerung im Innern der Bazillen (bipolar, central und etwas ausserhalb der Axe des Bazillus), sowie das Vorkommen von freien Granulis in homogenen Kulturen, welche einen Saum von alkoholbeständiger Substanz aufweisen, das Fehlen von Körnern, welches sich auf die

mente, além disso, a concordancia de parallelismo das granulações nos grumos bacilares são razões que militam pela necessidade da granulação para a vida do bacilo.

Essas granulações são córaveis pelos metodos de GIEMSA, ROSEBUSCH, DELAFIELD e HEIDENHAIN.

O metodo de GIEMSA merece alguns reparos especiais. Si se faz a fixação pelo alcool absoluto as granulações não se córam bem ; o bacilo apresenta-se com manchas vermelhas no seu interior ; a forma granular não é, porém, nitida. A fixação pelo calor revela a granulação, ora córada em vermelho intenso, ora em vermelho violaceo. O metodo de GIEMSA novo (fixação a humido) (1909) mostrou-nos nos bacilos massas córadas em vermelho, que apresentavam granulações mais intensamente córadas. Dá, entretanto, poucas minucias.

O metodo de ROSEBUSCH presta-se pouco ; os de HEIDENHAIN e DELAFIELD córam melhor.

Poder-se-ia julgar ser a granulação um produto artificial em virtude da tecnica de fixação (quando se não uzasse a fixação a humido), se ellas não fossem perfeitamente vizíveis pelo exame a fresco, principalmente, se se juntar á cultura a examinar um pouco de LUGOL.

Ainda nas preparações de culturas, quando córadas pelo GIEMSA, foi a nossa atenção despertada para o fato de aparecerem bacilos, inteiramente córados em azul, onde se não viam granulações. Como não vissemos isto nas culturas recentes em batata, e, como tivéssemos experimentado com culturas homogeneas antigas, interpretámos o fato, como sendo devido á morte desses bacilos.

Nas preparações fixadas pelo calor o LUGOL córa as granulações em violeta intenso, e posto em contato com emulsão de bacilos o reagente se descora de todo. Que estas granulações não possuem revestimento céreo ou graxo, quando exis-

wenigen Bazillen beschränkt, welche sich intensiv nach Gram färben, ausserdem die Uebereinstimmung im Parallelismus der Granulationen in den Bazillenkümpchen, sind Gründe, welche zu Gunsten der Unentbehrlichkeit der Granula für das Leben der Bazillen sprechen.

Diese Granula lassen sich nach den Methoden von GIEMSA, ROSEBUSCH, DELAFIELD und HEIDENHAIN färben.

Ueber die Methode von GIEMSA ist Folgendes zu bemerken : Geschieht die Fixation durch absoluten Alkohol, so färben sich die Granula nicht gut ; der Bazillus zeigt zwar rote Flecke in seinem Innern, aber die Körnchenform ist nicht deutlich. Dagegen zeigt die Fixation durch Hitze die Granula bald intensiv rot, bald violettrot gefärbt. Die neue Methode (mit feuchter Fixierung) von GIEMSA (1909) zeigte mir im Innern der Bazillen rotgefärbte Massen mit stärker gefärbten Körnchen, giebt jedoch wenig detaillirte Bilder.

Die Methode von ROSEBUSCH eignet sich sehr wenig ; die von HEIDENHAIN und DELAFIELD färben besser.

Wenn man keine feuchte Fixierung anwendet, könnte man die Körnchen für ein durch die Fixierung erzeugtes Kunstprodukt ansehen, wären sie nicht bei Untersuchung frischer Präparate deutlich wahrnehmbar, besonders nach dem Zusatz von etwas LUGOL'scher Lösung.

In nach GIEMSA gefärbten Präparaten von Kulturen fiel mir noch auf, dass ganz blau gefärbte Bazillen vorkamen, in denen man keine Granula sah. Da ich dies in frischen Kartoffelkulturen nicht beobachtet hatte und diese Untersuchung alte homogene Kulturen betraf, erklärte ich mir die Sache so, dass diese Bazillen abgestorben wären.

In durch Hitze fixirten Präparaten färbt LUGOL'sche Lösung die Granula intensiv violett und dasselbe Reagens entfärbt sich vollständig, wenn es mit einer Bazillenemulsion in Berührung gebracht wird. Dass diese Granula im Innern der Bazillen keine wachs- oder fettartige

tentes no corpo do bacilo, resulta da observação em gota pendente de cultura homogênea, usando-se a coloração vital com o azul de metileno. Vê-se aí que as granulações pouco a pouco aparecem coradas em azul palido, progressivamente intenso e não só ellas como também bacilos nos quais a substancia que constitue as granulações está difusa, sem diferenciação.

Nas culturas homogêneas antigas a maioria dos bacilos não se cora; isso facilmente se compreende atendendo á constituição química do corpo dos bacilos da tuberculose, extremamente ricos em substancias de natureza graxa.

O exame da cultura em gota pendente não mostrou de modo nitido evolução na forma da granulação. Tampouco conseguimos assistir á libertação da granulação; entretanto vêm-se numerosas formas bacilares onde as granulações se mostram apenas, fazendo saliencia ao corpo do bacilo de sorte que nas formas muito granulosas a apparencia dellas assemelha um tronco carregado de frutas sésseis, como se vê na fig. 1. de uma preparação fixada a humido pelo sublimado alcool e corada pelo meu metodo. Algumas vezes em preparados secos corados encontrámos formas bacilares com falta de uma ou outra granulação. Essas formas mostram espaços claros, não corados nos pontos onde deviam existir as granulações, fato, que junto á existencia de granulações livres na cultura ou no produto patológico, faz pensar que tenham ellas sido desagregadas dos bacilos. Indica ainda, haver qualquer coincidência na existencia da granulação e na divizão do bacilo, o fato de, nas formas ramificadas, ricas nas granulações mais volumozas, apresentarem-se as granulações, precisamente no ponto de dicotomia. Algumas vezes tal encontrámos em escarro de individuos tuberculosos sujeitos ao tratamento pela tuberculina (T. O. A.).

Procurámos então elucidar a função que a granulação exerce na biologia do bacilo e ensaiámos fazer a citologia deste.

Hülle besitzen, kann man aus der Beobachtung einer homogenen Kultur im hängenden Tropfen folgern, wenn man die vitale Methylenblaufärbung anwendet. Man sieht die Granula sich nach und nach, erst blässer und dann intensiv, blau färben und nicht nur diese, sondern auch die Bazillen, in welchen die körnchenbildende Substanz diffus und nicht differenziert vorkömmt.

In alten homogenen Kulturen färbt sich die Mehrzahl der Bazillen nicht, was sich leicht durch die chemische Zusammensetzung der an fettartigen Substanzen äusserst reichen Bazillen erklärt.

Die Beobachtung der Kultur im hängenden Tropfen liess keine deutliche Entwicklung der Körnchenform erkennen; auch gelang es mir nicht, das Freiwerden derselben zu beobachten. Man sieht jedoch zahlreiche Bazillenformen, denen die Granula angelagert sind, indem sie aus ihrem Leibe vorragen, so dass stark körnige Formen an einem mit sitzenden Früchten beladenen Stamm erinnern können, wie Fig. 1 zeigt, welche ein mit Sublimatalkohol fixiertes und nach meiner Methode gefärbtes Präparat darstellt. In gefärbten Trockenpräparaten fand ich manchmal Bazillenformen, bei denen das eine oder andere Körnchen fehlte; dieselben zeigten helle Lücken an den Stellen, wo die Granula sitzen sollten. Dieser Umstand, verbunden mit dem Vorkommen von freien Körnchen in Kulturen und pathologischen Produkten, lässt vermuten, dass letztere aus den Bazillen ausgestossen wurden. Auch der Umstand, dass in verzweigten Formen die an besonders grossen Körnchen reich sind, letztere gerade am Punkte der Dichotomie auftreten, weist auf eine Beziehung zwischen dem Vorkommen der Granula und der Teilung der Bazillen. Man beobachtet dies manchmal im Auswurf von Tuberkulösen, welche mit Tuberculin (T. O. A.) behandelt werden.

Ich habe dann versucht die Funktion aufzuklären, welche die Körnchen in der Biologie des Bazillus ausüben und die Cytologie des letzteren zu studieren und zwar

Para este fim estudámo-lo em culturas e em produtos patolojicos. Uzámos a tecnica de fixação humida de SCHAUDINN (sublimado-alcool) e os metodos de hematoxilina (metodo DELAFIELD e HEIDENHAIN.) Alem destes, uzámos o metodo de coloração que propuzemos em trabalho anterior e que dá a dupla coloração do bacilo.

Procedemos do seguinte modo: uma amostra de tuberculose humana, proveniente do Instituto de Higiene de Berlin, foi adaptada á cultura homojenea. As preparações feitas em laminula eram, logo apoz a distensão do material, fixadas em sublimado-alcool por 15 minutos. Passavam depois para o alcool a 70° onde permaneciam *no minimo* meia hora e daí para a agua (5 a 10 minutos) e depois para o seguinte banho córante (que reconhecemos como o melhor, apoz inumeros erros:

Hematoxilina DELAFIELD 50 gotas
 Agua 50 ccm.

Córar por 1 hora no minimo ou (o que é preferivel).

Hematoxilina DELAFIELD 1 ccm.
 Agua 20 ccm.

Corar durante 24 horas.

Diferenciar na seguinte mistura:

Alcool a 95° 50 ccm.
 Acido cloridrico 3 gotas
 Durante 20 a 30 minutos.

Este metodo nos deu bons resultados. Compreende-se, entretanto que possa deixar de satisfazer, quando aplicado a amostras diferentes das que foram uzadas no presente trabalho. Variarão naturalmente o tempo de coloração, a concentração do banho córante e o tempo de diferenciação com o gráo de resistencia que o bacilo opuzer á penetração do corante, assim como o melhor gráo de diferencia-

sowohl in Kulturen, als an pathologischen Produkten. Ich wandte die feuchte Fixierung mit Sublimatalkohol nach SCHAUDINN und die Hämatoxylinfärbungen nach DELAFIELD und HEIDENHAIN an. Ausserdem gebrauchte ich auch die von mir in einer früheren Arbeit vorgeschlagene Färbemethode, welche eine Doppelfärbung des Bazillus giebt.

Das Verfahren war wie folgt: Ein Stamm von menschlicher Tuberculose, aus dem Hygieneinstitut von Berlin wurde zu homogener Kultur gebracht. Die auf Deckgläschen hergestellten Ausstrichpräparate wurden sofort für 15 Minuten in Sublimatalkohol gelegt; von da kamen sie für eine halbe Stunde oder länger in Alkohol von 70°, von diesem für 5—10 Minuten in Wasser und endlich in die nachfolgende Färbelösung, welche ich nach unzähligen Misserfolgen als die beste erkannt hatte:

Hämatoxylinlösung nach
 DELAFIELD 50 Tropfen
 Wasser 20 ccm.

Färbung während einer Stunde im Minimum oder noch besser:

Hämatoxylinlösung nach
 DELAFIELD 1 ccm.
 Wasser 20 ccm.

Färbung während 24 Stunden.

Die Differenzierung erfolgt in folgender Mischung:

Alkohol (95°) 50 ccm.
 Salzsäure 3 Tropfen

Einwirkung 20—30 Minuten.

Diese Methode gab mir gute Resultate. Doch wird man verstehen, dass sie vielleicht weniger befriedigt, wenn sie auf andere, als die bei meiner Arbeit gebrauchten Stämme angewandt wird. Es müssen dann natürlicherweise die Färbungszeit, die Konzentration der Farblösung und die Zeit der Differenzierung nach dem Grade des Widerstandes, welchen

ção somente poderá ser determinado por ensaios previos. O mesmo se applica á hematoxilina de HEIDENHAIN que empregámos sob a seguinte technica :

Fixação : como no metodo anterior.
Alcool a 70° — meia hora.
Agua — 5 minutos.

Mordente :

Solução de alumen ferreo (a 3,5 %) 6 horas no minimo,

Lavagem em agua. —

Solução córante :

Hematoxilina HEIDENHAIN. 1 cc.
Agua 20 cc.

Corar durante 24 horas, diferenciar em :

Solução de alumen ferreo (a 1 %) 15 a 20 minutos.

Dezidratar — Fechar em balsamo.

Pelas preparações assim feitas pudemos verificar, ser a função que a granulação exerce, não só importante, como *essencial*, á vida do bacilo. Acompanhando o desenvolvimento das culturas homogeneas vemos que a granulação, por processo de divizão, analogo á gemulação, dá orijem a a outras granulações, que por sua vez se tornam centros de reprodução. Durante certa faze de desenvolvimento da cultura, essas granulações conservam-se ligadas por delgados filamentos, constituindo grumos (Est. 16, Fig. 2 e 2a), o que explica (juntamente com o meio de reprodução acima referido) tanto o paralelismo dos bacilos nos grumos, como a correspondencia linear e as diferenças de volume das granulações. Com o desenvolvimento da cultura e consequentemente com o desenvolvimento do bacilo, o deposito de substancias diversas, por elle elaboradas, principalmente os corpos de natureza graxa, sobrecarregam-no, de modo a se romperem os filamentos de ligação, e a divizão se faz em um ou outro sentido, de acordo com um plano de

der Bazillus der Färbung entgegensetzt, wechseln, ebenso kann auch das Optimum der Differenzierung nur durch Vorversuche festgestellt werden. Dasselbe gilt vom Hämatoxylin nach HEIDENHAIN, bei welchem ich folgendes Verfahren anwandte :

Fixation wie oben.
Alkohol (70°) — 30 Minuten.
Wasser — 5 Minuten.

Beize :

Eisenaunlösung (3,5%) im Minimum 6 Stunden lang, dann waschen im Wasser, von da in folgende Färbelösung :

Hämatoxylinlösung nach HEIDENHAIN 1 ccm.
Wasser 20 ccm.

Färbung während 24 Stunden, dann Differenzierung in : Eisenaunlösung (1%) während 15-20 Minuten, hierauf Entwässern und Einschluss in Kanadabalsam.

An so hergestellten Präparaten konnte ich sehen, dass die Funktion der Granula eine nicht bloss wichtige, sondern selbst für das Leben des Bazillus unentbehrliche ist. Verfolgt man die Entwicklung der homogenen Kulturen, so sieht man, dass die Granula durch einen Teilungsprozess, welcher der Sprossung analog ist, neue Granula entstehen lassen, welche wiederum zu Reproduktionzentren werden. Während einer gewissen Entwicklungsperiode der Kultur bleiben diese Granula durch zarte Fäden vereinigt und bilden kleine Massen (Fig. 2 und 2 a), was, in Kombination mit der geschilderten Vermehrungsweise, erklärt, warum die Bazillen in den Masse parallel gelagert sind und die Granula sich linienweise entsprechen und eine verschiedene Grösse zeigen. Bei fortschreitender Entwicklung der Kulturen und der darin enthaltenen Bazillen werden letztere durch die, in ihnen gebildeten und abgelagerten, Substanzen von vorwiegend fettiger Natur überladen, so dass die verbindenden Fäden brechen und die Teilung, in Uebereinstimmung mit der Teilungsebene, welche

divisão que separa os corpos dos bacilos (Est. 16, Figs. 3 e 3 a). Aí mesmo se vê a correspondência absoluta das granulações e a delgada camada de substancia que une os corpos bacilares.

Ponto importante a esclarecer é a divisão da granulação. Nas preparações fortemente diferenciadas observam-se granulações refrinjentas, *nas quais nitidamente se vê um plano de divisão, de modo a se formarem duas porções desiguais, que apresentam as bordas côradas mostrando haver aí condensação de substancia cromatica*; o centro da granulação apresenta-se então *como ponto não côrado* (Est. 16, Figs. 4 e 5). Em virtude dessa divisão desigual, é, que se nota nos grumos sempre uma granulação maior que todas as outras (Est. 16, Fig. 5). Explicar-se-ia esse fato considerando a granulação como sistema cromidial, já orientado para a subsequente divisão e que acarretasse nesse processo a porção de plasma, conveniente á ultimação delle para formação do organismo novo. A demonstração disso é-nos dada pela observação não só nas culturas como nos produtos patolojicos, de formas granulares cercadas de delgada camada de substancia onde pelas reações côradas se nota já a formação de corpos alcool-resistentes (Est. 16, Fig. 6), que sómente podem ser interpretados como produtos de elaboração celular. Seria, como diz MESNIL (1905) quando se refere ao trabalho de SCHAUDINN sobre a *Ameba testacea*, seria um *cromidio morfologicamente* homologo ao do *Actinospharium*, que, porém, *fisiologicamente* é de natureza diversa por possuir função reprodutora e não vejetativa.

Que a granulação se divide mesmo *isolada do corpo do bacilo* parece-nos fóra de duvida pela observação das figuras 7, 7a, e 7b da Est. 16, e admitindo isso que nos parece provado, a granulação não só representaria *o centro de reprodução* do bacilo como poderia ser considerada como a unidade vital; isto é, cada granulação representaria uma unidade viva. Cada bacilo como hoje em dia é considerado pas-

die Bazillen trennt, in einer oder der anderen Richtung erfolgt (Fig. 3, 3a), wobei man die entsprechende Lagerung der Körner und die dünne Verbindungsschicht zwischen den Bazillen wahrnimmt.

Eine Frage, denen Aufklärung sehr wichtig ist, betrifft die Teilung der Granula. In stark entfärbten Präparaten findet man lichtbrechende Körner, *in denen man deutlich eine Teilungsebene sieht, durch welche zwei ungleiche Portionen gebildet werden, welche gefärbte Säume zeigen, was eine Kondensation der chromatischen Substanz beweist*; das Zentrum des Kornes erscheint dann *als ungefärbter Punkt* (Fig. 4, 5). In Folge dieser ungleichen Teilung sieht man in den Klümpchen immer ein Granulum, welches grösser ist, als die übrigen (Fig. 5). Man kann dies so erklären, dass man das Korn als ein Chromidialsystem auffasst, welches schon für die nächste Teilung vorbereitet ist und dabei die Plasmamenge einschliesst, welche zur Vollendung desselben für die Bildung eines neuen Organismus nötig ist. Es ergibt sich dies durch die in Kulturen und an pathologischen Produkten gemachte Beobachtung, von körnigen Bildungen, die von einer dünnen Substanzschicht umgeben sind, in welcher die Färbereaktionen bereits die Bildung alkoholresistenter Körper nachweist (Fig. 6), die nur als die Produkte einer Zelltätigkeit aufgefasst werden können. Wie MESNIL (1905), mit Rücksicht auf die SCHAUDINN'sche Arbeit über *Amoeba testacea*, sagt, wäre dies ein morphologisch demjenigen des *Actinospharium* homologes Chromidium, welches aber physiologisch anderer Natur ist, da es reproduktive und nicht vegetative Funktion besitzt.

Dass die Granula sich, *auch vom Bazillenkörper getrennt*, teilen, scheint mir aus den Figuren 7, 7a und 7b deutlich hervorzugehen. Gibt man dies zu, was mir erwiesen scheint, so repräsentiert das Granulum nicht nur das Reproduktionszentrum des Bazillus, sondern auch die vitale Einheit, d. h. jedes Körnchen stellt ein lebendes Individuum vor. Jede, heute als

saria a ser constituído de tantas unidades vivas quantas granulações reprodutoras possui. Seria uma pequena colonia. E isso é demonstrado pelas preparações de culturas em pele, onde se nota que um unico bacilo (o maior das figuras) se pode reproduzir não só no sentido transverso, (Est. 16, figs. 8 e 9) originando grumo, como no sentido longitudinal á custa da granulação formada lateralmente (fig. 10). Isso se dá na direção de um dos polos do bacilo (Est. 16, fig. 10) ou obliquamente em relação ás granulações intermedias, criando assim as formas dicotomicas. (Est. 16, fig. 11) ou ramificadas ou novos grumos, quando se dá a fragmentação. O mesmo se observa nas culturas homogeneas com preparados corados pela hematoxilina DELAFIELD (Est. 16, fig. 3).

Esta concepção seria confirmada ainda pelo fato observado e representado pelas figs. 12, 12a, 12b, 12c e 12d, da Est. 16 que, se fossem interpretadas como divizão longitudinal do bacilo iriam de encontro a tudo quanto está estabelecido em relação á divizão dos bacterios. Entretanto, o fato não é paradoxal, deriva exclusivamente do emprego do termo *bacilo* em relação á tuberculose, considerando-o como *unidadc viva*. Substituamol-o pelo termo *colonia* e poderemos compreender a *clivagem* dessa colonia pelo mecanismo acima referido. A expressão mais simples da colonia é aquillo que hoje em dia denominamos bacilo. A clivagem desse bacilo representaria não um proceso de divizão delle porém um proceso de reprodução da colonia. Trata-se de nova confirmação da majstral concepção de HARTMANN (1909) sobre os nucleos poli-enerjeticos amplamente demonstrada por este autor entre os protozoarios e que como fato biologico de ordem geral não podia deixar de ser representada entre os bacterios. Si por acaso essa verificação não pode ser feita morfologicamente em todos os pontos, deriva exclusivamente do tama-

Bazillus angesehene, Einheit wäre dann aus so vielen Individuen zusammengesetzt, als sie reproduktive Körnchen besitzt, und wäre eine kleine Kolonie. Dies ergibt sich aus Präparaten von Hautkulturen, wo man sieht, dass ein einzelner Bazillus (der grösste der Figuren) sich nicht nur in transversaler Richtung (Figs. 8, 9) vermehren kann, wodurch sich ein Klümpchen bildet, sondern auch in der Längsrichtung durch eine seitlich gebildete Granulation (Fig 10). Dies geschieht in der Richtung eines der Pole des Bazillus (Fig. 10) oder in schräger Abzweigung in Hinsicht auf die intermedären Granula, wodurch dichotome Formen entstehen (Fig. 11) oder auch neue Klümpchen im Falle eintretender Fragmentation. Dasselbe beobachtet man an der homogenen Kultur in den mit Hämatoxylin nach DELAFIELD gefärbten Präparaten (Fig. 3).

Eine weitere Bestätigung dieser Auffassung wäre noch durch die in Figur 12, 12a, 12b, 12c und 12d wiedergegebene Beobachtung gegeben, welche, als eine Längsteilung gedeutet, allem zuwiderlaufen würde, was bisher über die Teilung der Bakterien festgestellt wurde. Doch ist das Factum an und für sich nicht paradox, sondern nur durch die Anwendung des Ausdrucks *Bazillus* bei der Tuberculose als Bezeichnung des *einzelnen lebenden Individuums*. Substituiert man ihn durch *Kolonie*, so kann man die *Teilung* derselben durch den geschilderten Mechanismus verstehen. Der einfachste Ausdruck der Kolonie ist dasjenige, was wir heute als *Bazillus* bezeichnen und die Spaltung desselben würde nicht seine Teilung, sondern einen Reproduktionsprozess der Kolonie bedeuten. Es handelt sich um eine neue Bestätigung der meisterhaften Auffassung von HARTMANN über polyenergetische Kerne, welche von ihm bei Protozoen in weitem Umfange erwiesen wurde, und welche, als biologische Tatsache von allgemeiner Tragweite, auch bei den Bakterien vertreten sein musste. Wenn diese Feststellung zufällig nicht in allen Punkten morphologisch gemacht werden kann, so

nho excessivamente pequeno da granulação que, mesmo sob os mais fortes aumentos (obj. apocrom. 2 mm. e oc. 18 ZEISS) não deixa que se observem figuras de mitoze no seu interior.

A granulação no bacilo da tuberculose representa pois a mesma função que o conídio dos cogumelos; é o que resulta da observação das formas análogas ás formas de frutificação daquelles vegetais inferiores, formas que são observáveis na tuberculose, tanto nas culturas homogeneas, como nos produtos patológicos. A propria divisão da granulação mostra que ha formação de conídios secundarios (Est. 16, fig. 7a) análogos aos encontrados por BREFELD (1871) na *Empusa muscae*. Isso explica a razão porque a tuberculose não reziste ás causas de destruição á que geralmente rezistem os organismos que possuem os verdadeiros esporios (esporios diferenciados, endosporios). A granulação sendo verdadeiro conídio ou exosporio explica, porque o virus da tuberculose reziste pouco ao calor, como succede e é fato sabido geralmente, com os cogumelos, que por esse modo frutificam.

Não se pense haver confusão nas referencias sucessivas que fazemos ás expressões sistema cromidial, nucleos polienerjeticos e conídio dos cogumelos. A concepção de HARTMANN identifica a função do cromidio generativo á dos nucleos polienerjeticos de modo que estes representam relativamente á reprodução do organismo primitivo precisamente a mesma função que as granulações reprodutoras observadas na tuberculose.

Trata-se na tuberculose *fisiologicamente* e não *morfologicamente* (porque não pudemos acompanhar as fazes todas do processo intimo de divisão da granulação) *do mesmo papel representado pelos nucleos polienerjeticos na reprodução dos protozoarios.*

ist dies ausschliesslich eine Folge der geringen Grössen der Granula, die selbst bei den stärksten Vergrösserungen (Apochr. 2mm, Oc. 18 von ZEISS) nicht gestattet, in ihrem Innern Mitosefiguren wahrzunehmen.

Die Granulation entspricht also beim Tuberkelbazillus derselben Funktion, wie sie das Conidium der Pilze ausübt; es geht dies aus der Beobachtung von Formen hervor, welche den Fruktifikationsformen dieser niedern Pflanzen analog sind und bei der Tuberculose, sowohl in homogenen Kulturen, als auch in pathologischen Produkten, beobachtet werden. Die blosse Teilung der Granula zeigt, dass eine Bildung sekundärer Conidien stattfindet (Fig. 7a), analog denjenigen wie sie BREFELD (1871) bei *Empusa muscae* fand. Dies erklärt uns den Grund, warum die Tuberculose zerstörenden Einflüssen nicht widersteht, welchen Organismen mit ächten Sporen (differenzierte oder Endosporen) Stand halten. *Das Granulum der Tuberculose, als ächtes Conidium oder Exospore*, erklärt, warum das Virus der Hitze wenig widersteht, wie dies ja auch bei Pilzen, die sich auf solche Art fortpflanzen, geschieht, was allgemein bekannt ist.

Man denke nicht, dass es sich bei der wiederholten Erwähnung der Ausdrücke Chromidialsystem, polyenergetische Kerne und Pilzconidien um eine Verwechslung handle. Die Auffassung von HARTMANN identifizirt die Funktion des generativen Chromidiums mit diesem der polyenergetischen Kernen, so dass die in Hinsicht auf die Reproduction des primitiven Organismus dieselbe Funktion erfüllen, wie die der Fortpflanzung dienenden Granula, welche man bei der Tuberculose beobachtet.

Es handelt sich bei der Tuberculose um eine physiologische und nicht morphologische Uebereinstimmung mit der Rolle, welche die polyenergetischen Kerne bei der Vermehrung der Protozoen erfüllen da ich die Phasen des Teilungsvorganges nicht in ihren Einzelheiten genauer verfolgen konnte.

Ainda *fisiologicamente* o papel das granulações reprodutoras na tuberculose é analogo ao papel dos conídios dos cogumelos : em ambos os casos se trata do elemento gerador do organismo primitivo ; no caso particular da tuberculose ellas originam granulações menores que se conservam ligadas por delgados filamentos, como se fosse um esboço da organização de micelio dos cogumelos, e mostram ser a forma mais resistente da vida do parasito da tuberculose.

A identificação com o micelio dos cogumelos não pode ser feita por não se observar a formação de septos, nem se poder acompanhar o fenomeno intimo da organização da granulação.

O papel, que a granulação exerce em relação ao organismo infetado por tuberculose é tambem preponderante. Já MUCH (1907) determinára *in vitro* a transformação da granulação em bacilo e *in vivo* a natureza infetante da *forma granular* no puz tuberculoso ; aí porem objetar-se-ia que bacilos inteiros pudessem ser injetados com o material em experiencia. Tornava-se pois necessario obter a granulação separada do resto do material para verificar a sua ação sobre o organismo vivo. Com esse intuito instituímos as seguintes experiencias :

Exp. I. 5 ccm. de puz cazeozo de cobaia infetada com bacilo humano foram diluidos em 20 ccm. de agua fisiologica e filtrado o produto em vela BERKEFELD (modelo NORDMEYER). O produto obtido por filtração foi dividido em duas porções iguais. Uma foi centrifugada e o sedimento obtido mostrou em preparado microscopico corado por GRAM e fuchsin diluida a existencia de granulações e de detritos de bacilos não revelaveis pelo ZIEHL-acido azotico ao terço.

A outra porção foi inoculada sob a pele de uma cobaia. *Não se formou can-*

Ebenfalls physiologisch stimmt die Rolle der bei der Tuberculose der Fortpflanzung dienenden Granula mit derjenigen der Conidien bei den Pilzen überein : in beiden Fällen handelt es sich um das Element, welches den ursprünglichen Organismus erzeugt ; dasselbe bildet bei der Tuberculose kleinere Granula, welche durch zarte Fäden verbunden bleiben, wie wenn es sich um eine Andeutung der Organisation des Pilzmyceliums handelte und erweist sich als die widerstandsfähigste Lebensform des Parasiten der Tuberculose.

Eine Identification mit dem Nycelium der Pilze kann deshalb nicht gemacht werden, weil die Bildung von Septen nicht beobachtet wurde und auch der feinere Organisationsprozess der Granula nicht verfolgt werden konnte.

Die Rolle, welche die Granula dem mit Tuberculose infizierten Organismus gegenüber spielen, ist ebenfalls von grösster Wichtigkeit. Schon MUCH (7) (1907) hatte *in vitro* die Verwandlung der Granula in Bazillen und *in vivo* die infektiöse Natur der *granulösen Form* bei der Tuberculose festgestellt ; hier konnte man jedoch einwerfen, das möglicherweise mit dem Versuchsmaterial ganze Bazillen injiziert wurden. Es wurde daher nötig, die Granula getrennt von dem übrigen Materiale zu erhalten, um ihre Einwirkung auf den lebenden Organismus festzustellen. Zu diesem Zwecke stellte ich folgende Versuche an :

Erster Versuch : Es werden 5 ccm. käsigen Eiters eines mit Bazillen menschlicher Abkunft infizierten Meerschweinchens in 20 ccm. physiologischer Lösung verteilt und das Produkt auf einem BERKEFELD'schen Filter (Modell von NORDMEYER) filtriert. Das Filtrat wurde in zwei gleiche Portionen geteilt ; die eine wurde zentrifugiert und das erhaltene Sediment zeigte im mikroskopischen, mit GRAM und verdünntem Fuchsin gefärbten. Präparate das Vorkommen von Körnchen und Bazillendetritus, welche durch ZIEHL und Salpetersäure (1:2) nicht nachweisbar waren.

cro no ponto de inoculação; o material inoculado tinha-se reabsorvido todo sem reação aparente quando 15 dias após a inoculação começou a esboçar-se sinal de reação ganglionar que se traduzia por aumento de volume e endurecimento dos ganglios inguinais correspondentes ao ponto onde fora praticada a inoculação. O animal foi sacrificado um mez depois da inoculação e mostrou por autopsia ganglios inguinais aumentados de volume, duros e hiperemiados. Preparações por esfregaço mostraram ausencia de bacilos da tuberculose, e existencia de granulações incluídas em linfócitos. O baço aumentado de volume e conjesto, mostrava em córtes infiltração linfocitaria e hemorragias intersticiais, ausencia de bacilos, presença de granulações incluídas em celulas embriónicas (Est. 17, fig. 13).

Em ambos os organs não houve formação de puz.

Exp. II. Para verificar se a reação obtida no animal corria por conta da existencia de bacilos uma quarta parte do baço foi injetada, depois de finamente dividida sob a pele de uma cobaia. Oito dias depois formou-se um nodulo duro no ponto da inoculação e um mez depois ainda permanecendo elle e havendo pequeno aumento de volume dos ganglios da rejão foram essas duas lezões retiradas por biópsia. Examinadas por córtes em serie não mostraram reação tuberculosa, de anormal nelles só se encontrou pigmento hematico.

Aquellas reações são analogas ás que se produzem na infeção tuberculosa e identicas ás descritas por AUCLAIR e PARIS quando estudam a bacilocazeina por elles isolada. Seria pois atribuível á esta a reação obtida pela inoculação do puz filtrado. No entanto, como o exame microscopico do produto injetado revelasse a presença de numerosas granulações analogas ás do bacilos e com a mesma reação córante, não

Die andere Portion wurde einem Meerschweinchen unter die Haut gespritzt. Es bildete sich am Orte der Einimpfung kein chancröses Geschwür und das Material war ohne sichtbare Reaktion resorbiert worden, als plötzlich 15 Tage nach der Einimpfung eine Drüsenreaktion zu erscheinen begann, welche sich der Injektionsstelle entsprechend durch eine Vergrößerung und Verhärtung der Leisten-drüsen äusserte. Das Tier wurde nach einem Monate getötet und zeigte bei der Autopsie die geschwollenen Leisten-drüsen hyperämisch und von harter Konsistenz. Ausstrichspräparate zeigten das Fehlen von Tuberkelbazillen und das Vorkommen in Lymphocyten eingeschlossener Granula. Die Milz, vergrößert und blutreich, zeigte auf Schnitten eine Infiltration mit Lymphocyten und interstitielle Hämorrhagien. Fehlen von Bazillen und Vorkommen von in Embryonalzellen eingeschlossenen Granulis (Mikrophotographie, Fig. 13).

In beiden Organen war kein Eiter gebildet worden.

Zweiter Versuch: Um festzustellen, ob die bei dem Tiere festgestellte Reaktion auf Rechnung des Bazillus kam, wurde ein Viertel der Milz fein zerteilt und einem Meerschweinchen unter die Haut gespritzt. Acht Tage später bildete sich ein hartes Knötchen an der Injektionsstelle, und, da dasselbe nach einem Monate noch weiter bestand und die regionären Lymphdrüsen etwas vergrößert waren, wurden beide Läsionen durch Biopsie entfernt. In Serienschnitten untersucht, zeigten sie keine tuberkulöse Reaktion und ausser Blutpigment fand sich nichts abnormes in denselben.

Jene Reaktionen sind denjenigen, welche bei der tuberkulösen Infektion auftreten analog und identisch mit den, von AUCLAIR und PARIS (8) beim Studium des von ihnen isolierten Bazillencaseins beschrieben. Es wäre daher gestattet, diesem die durch Injektion filtrierten Eiters erhaltene Reaktion zuzuschreiben. Da indessem die mikroskopische Untersuchung des injizierten Produktes das Vorkommen von

seria descabido pensar exercerem ellas o principio tuberculijeno.

Podia-se ainda objectar serem as granações encontradas no puz resultado de alteração celular, granações proteicas não especificas. Com o fim de elucidar esses pontos, procedi ao estudo da bacilocazeína de AUCLAIR, preparando-a sob a tecnica indicada por esses autores, no trabalho já citado. O produto obtido apoz os diferentes tratamentos (dezengorduramento completo; ação de acido acetico puro a 80° C.; ação de alcool a 80° como ajente de lavagem do produto precipitado pela neutralização incompleta do meio; ação de alcool a 95. como clarificador, mostrou-me sempre quando córado pelo GRAM e fuchsina diluida e examinado ao microscopio a existencia de duas substancias: uma que tomava o GRAM — esta era representada por bacilos que ainda conservavam a sua forma e por numerosas granações livres — e outra que se corava facilmente pela fuchsina diluida.

Era pois a bacilo-cazeína de AUCLAIR e PARIS um produto complexo e a reação por aquelles autores descrita poderia correr por conta tanto do produto que tomava o GRAM como do que se córava pela fuchsina. Impunha-se, pois, obter a separação dessas duas substancias para que se pudesse formar juizo definitivo sobre sua ação patojenica.

Pelas reações córantes mostravam-se essas duas substancias de natureza diversa, uma das quais de função puramente acida — a das granações. Entretanto, quer a acidulação do meio, quer a sua alcalinização cuidadosa não nos poude fornecer nenhuma dessas substancias izolada.

Outro caminho seria obter a separação dellas por meio de filtro. Para isso tratámos a bacilo-cazeína que tinhamos preparado com uma solução de fosfato neutro de sodio. A dissolução não foi com-

Granulis nachweist, welche denjenigen der Brazillen ähnlich sind und dieselbe Färbereaktion zengen, scheint die Auffassung gestattet, dass sie das tuberkelerzeugende Prinzip darstellen.

Man könnte noch einwenden, dass die im Eiter gefundenen Granula Folge einer Alteration der Zellen und eiweissartige Körnchen ohne spezifische Reaktion seien. Um diesen Punkt aufzuklären, machte ich mich an das Studiums des Bacillocaseins von AUCLAIR, indem ich es nach der, von den Autoren in der oben erwähnten Arbeit angegebenen, Technik darstellte. Das Produkt der verschiedenen Manipulationen (vollständige Entfettung, Einwirkung reiner Essigsäure bei 80 Grad, Waschen des durch unvollständige Neutralisation gefällten Produktes mit 80° Alkohol, Reinigung mit 95° Alkohol) zeigte, nach Fuchsinach GRAM und mit verdünnter Fuchsinlösung, unter dem Mikroskope das Vorkommen zweier Substanzen: eine, die sich nach GRAM färbte und aus gut erhaltenen Bazillen und zahlreichen freien Körnern bestand und eine, die sich leicht mit verdünnter Fuchsinlösung färbte.

Das Bacillocasein von AUCLAIR und PARIS war also ein zusammengesetztes Produkt und die von den Autoren beschriebene Reaktion konnte ebensogut auf Rechnung des GRAM-positiven Produktes, als auf diejenige des fuchsingefärbten kommen. Es erschien also die Trennung dieser beiden Substanzen geboten, um ein definitives Urteil über ihre pathogene Wirkung zu gewinnen.

Bei der Färbung zeigte sich die verschiedene Natur dieser beiden Substanzen, von denen eine, die der Granula, als Säure funktionierte. Doch konnte mir weder die Ansäuerung des Mediums, noch seine sorgfältige Alkalinisierung eine der Substanzen isoliert ergeben.

Eine andere Möglichkeit wäre, dieselben durch Filtrieren zu trennen. Zu diesem Zwecke behandelte ich das von mir isolierte Bacillocasein mit einer Lösung von neutralem Natriumphosphat. Die Lösung war keine vollständige; in der Ruhe bil-

pleta, deixada em repouzo forneceu um sedimento que examinado ao microscopio em preparações córadas pelo GRAM — fuchsina diluida mostrou numerosos bacilos em cuja maioria não se viam mais granulações e que tomaram facilmente a fucsina diluida (Est. 16, Figs. 14 e 15).

Decantado o liquido foi elle filtrado em véla CHAMBERLAND. Ainda neste produto não conseguimos obter precipitação quer pela acidulação quer pela alcalinização. Pelo exame do sedimento apóz centrifugação nada pudemos concluir de positivo.

Recorremos então a ultra-filtração em véla PUKAL induzida de colodio. Apoz filtração a camada de colodio foi dissolvida em eter. As preparações feitas com esse material, córadas pelo GRAM, nos mostravam a existencia de granulações incluídas em substancia que se córava facilmente pela fuchsina diluida. A centrifugação ainda nenhum rezultado positivo nos poude fornecer.

No entanto, uzando de um processo, indireto, se não pudemos provar de modo irrecuzavel a natureza química da granulação, os resultados que obtivemos indicam e aduzem argumentos em favor da idea de ser ella constituida pela bacilo-cazeína.

Fazendo uma emulsão de bacilos de tuberculoze dezengordurados em uma solução de bicarbonato de calcio obtivemos, apoz permanencia na estufa a 38.º C., por 48 horas ou apoz ebulição da emulsão, um produto liquido que, filtrado e deixado evaporar sobre vidro de relojio forneceu cristais de fosfato bicalcico de mistura com carbonato pulverulento. Se adicionavamos a esse liquido sulfato de magnezio, amonia e cloridrato de amoniaco, obtinhamos o fosfato cristalizado sob a forma de fosfato amoniaco magneziano. Esse mesmo rezultado obtivemos com uma solução de sacarato de calcio acidulada pelo acido cítrico.

Em concordancia com esse fato constatava-se o dezaparecimento de grande numero de granulações e as preparações

dete sich wieder ein Bodensatz, der in, wie oben gefärbten, mikroskopischen Präparaten zahlreiche Bazillen zeigte, welche grösstenteils keine Körner mehr enthielten und die verdünnte Fuchsinlösung leicht aufnahmen (Fig. 14, 15).

Nach der Dekantierung wurde die Flüssigkeit durch eine CHAMBERLAND'sche Kerze filtriert. Auch jetzt konnten wir weder durch Ansäuerung, noch durch Alkalinisierung, ein Präcipitat erhalten. Die Untersuchung des Sedimentes nach dem Zentrifugieren ergab nichts positives.

Ich versuchte dann die Ultrafiltrierung mittelst eines mit Collodium überzogenen PUKAL-Filters; nach der Filtration wurde die Kollodiumschicht in Aether aufgelöst. Mit diesem Material gemachte und nach GRAM gefärbte Präparate zeigten das Vorkommen von Granulis in einer Substanz, welche sich leicht mit verdünnter Fuchsinlösung färbte. Die Zentrifugierung konnte mir auch hier kein positives Resultat geben.

Gelang es mir auch nicht, die chemische Zusammensetzung der Granula in unwiderleglicher Weise zu zeigen, so erhielt ich immerhin durch Anwendung eines indirecten Prozesses Resultate, welche darauf hinweisen und zu Gunsten davon sprechen, dass sie aus Bazillocasein bestehen.

Machte ich von entfetteten Tuberkelbazillen eine Emulsion ei einer Lösung von Kalciumbikarbonat, so erhielt ich, nach 48stündigem Verweilen im Brütschrank von 38º oder nach Kochen der Lösung, ein flüssiges Produkt, welches nach Filtration und Verdunstung im Uhrglase basisch phosphorsauen Kalk, mit einem pulveförmigen Karbonate gemischt, hinterliess. Setzte ich der Flüssigkeit Magnesiumsulfat, Ammoniak und Salmiak zu, so erhielt ich krystallisiertes Phosphat in der Form von phosphorsaurer Ammoniummagnesia. Dasselbe Resultat erhielt ich mit einer Lösung von Zuckerkalk, die mit Zitronensäure angesäuert war.

In Uebereinstimmung mit dieser Tatsache konstatierte ich das Verchwinden einer grossen Zahl von Körnern und die

mostravam a maioria dos bacilos facilmente coráveis pela fucsina diluída, em cujo corpo notavam-se manchas claras semelhando pequenos vacuolos (Est. 16, fig. 16). Essas preparações e as reações obtidas *in vitro* com os sais soluveis de calcio indicam claramente que a granulação do bacilo de tuberculose se comportava aí como a caseína de leite em meio ácido. As granulações são pois constituídas, se não em sua totalidade pelo menos na sua maior massa por uma *para-nucleoalbumina* analoga ou provavelmente identica á bacilo-caseína. O desaparecimento das granulações e a reação obtida com os sais soluveis de calcio acima referida talvez possam explicar a calcificação dos tuberculos como processo natural de cura na infeção tuberculosa.

A cobaia, que servira para a exp. II, conservou-se com saúde aparente durante cinco mezes, prazo, durante o qual ella permaneceu em observação. Ao cabo desse tempo foi sacrificada. A autopsia não mostrou alteração macroscopica dos organs a não ser diminutos focos hiperemiados na base do pulmão e pequeno aumento no volume do baço. Ganglios normaes e não conjestos.

Foram retirados fragmentos dos ganglios, baço e pulmões para exame microscopico.

Os côrtes dos ganglios e pulmões mostraram bacilos da tuberculose em numero muito pequeno porém caracterizaveis pela hematoxilina e Ziehl acido azotico ao terço; ZIEHL-GRAM (alcohol-acetona ao terço) (Est. 16, figs. 17 e 18).

Não se observou reação tuberculosa constituida nitidamente. Esta sómente se traduzia por grande infiltração linfocitaria.

Os resultados obtidos pela inoculação dessa cobaia permittem algumas considerações que nos parecem da maior monta para o tão debatido assunto de tuberculose latente. Em verdade não se poderá explicar de outro modo a permanencia no organismo da cobaia de elementos vivos (gra-

Präparate zeigten die Mehrzahl der Bazillen mit verdünnter Fuchsinlösung leicht färbbar und in ihrem Innern helle Flecken, die wie kleine Vakuolen aussahen (Fig. 16). Diese Präparate und die, *in vitro* mit löslichen Kalksalzen erhaltenen, Reaktionen weisen deutlich darauf hin, dass sich die Granula des Tuberkelbazillus dabei wie das Casein der Milch in Gegenwart von Säuren verhielten. Die Granula bestehen also, wenn nicht ganz, so doch zum grössten Teile, aus einem *Paranucleoalbumin*, welches dem Bacillo-casein analog und wahrscheinlich mit demselben identisch ist. Das Verschwinden der Granula und die erhaltene Reaktion können uns die Verkalkung der Tuberkel als einen natürlichen Heilungsprozess der tuberkulösen Infektion erklären.

Das Meerschweinchen, welches zum zweiten Versuche gedient hatte, wurde während fünf Monaten beobachtet und blieb während dieser Zeit anscheinend gesund. Es wurde dann getötet und die Autopsie ergab in den Organen keine makroskopischen Veränderungen ausser unbedeutenden hyperämischen Heerden der Lungenbasis und einer geringen Grössenzunahme der Milz. Die Leistendrüsen waren normal und nicht hyperämisch.

Von Lymphdrüsen, Milz und Lungen wurden Fragmente für die mikroskopische Untersuchung entnommen.

Die Lymphdrüsen- und Lungen-schnitte zeigten Tuberkelbazillen in sehr geringer Zahl, welche aber durch Hämatoxylin, Ziehl und Salpetersäure (1:2), sowie Ziehl-Gram und Alkohol-Aceton (1:2) leicht darstellbar waren (Fig. 17, 18).

Eine gut gekennzeichnete tuberkulöse Reaktion wurde nicht gefunden; dieselbe äusserte sich nur durch eine starke Leukozyteninfiltration. Die, durch die Impfung bei diesem Meerchweinchen erhaltenen, Resultate geben Anlass zu einigen Betrachtungen, die mir für die vielbesprochene Frage der latenten Tuberculose von grösster Wichtigkeit scheinen. In der Tat liess sich das Fortbestehen lebender Elemente (Granula), die in Serien aus-

nulações) que por serie forneçam bacilos constituídos, reveláveis pelos metodos de coloração especifica.

Durante cinco mezes o animal não reuiu por nenhum sinal macroscopico. Não houve constituição de cancro no ponto de inoculação, não houve formação de puz no interior dos ganglios, o volume destes era normal. *Nada indicava haver bacilos no interior dos ganglios nem dos orgãos internos; a falta de reação era tão clara que não prezumiamos tratar-se de animal infetado com tuberculoze.* Entretanto, o exame dos córtes mostrou, *que nessa cobaia, que viveu durante cinco mezes sem sinal de molestia, sem reação alguma que fizesse prezumir tuberculoze e sendo sacrificada não mostrou lezão mais notavel que a infiltração linofocitaria, havia granulações e bacilos constituídos.*

Tratando-se de um animal sensível á tuberculoze como a cobaia esses fatos nos indicam que devem ser elles applicados tambem aos homens, onde os cazos de tuberculoze latente são previstos pela razão e onde, se forem confirmados experimentalmente, como conseguimos verificá-los na cobaia, poderá ser substituida senão inteiramente, pelo menos em grande parte dos cazos a noção de *terreno tuberculizavel* pela de *terreno com tuberculoze em potencial.*

CONCLUZÕES

- 1.º As granulações do bacilo da tuberculoze são constituídas por substancia de natureza cromatica.
- 2.º O bacilo da tuberculoze deve ser considerado como uma reunião de unidades vivas que são representadas pelas granulações reprodutoras.

gebildete, durch spezifische Färbereaktion nachweisbare Bazillen liefern, nicht anders erklären.

Während fünf Monaten reagierte das Tier durch kein makroskopisches Symptom. Es bildete sich an der Impfstelle kein chancröses Geschwür und kein Eiter in den Lymphdrüsen, deren Volumen normal war. *Nichts wies darauf hin, dass Bazillen im Innern der Lymphdrüsen und der innern Organe existierten; das Fehlen einer Reaktion war so deutlich, dass ich nicht glaubte, dass es sich um ein tuberkulöses Tier handle.* Dennoch zeigte die Untersuchung von Schnitten, *dass bei diesem Meerschweinchen, welches fünf Monate ohne Krankheitserscheinungen, ohne eine Reaktion, die auf Tuberkulose deutete, lebte, und getötet keine wichtigere Veränderung, als eine Rundzelleninfiltration aufwies, Granula und ausgebildete Bazillen vorhanden waren.*

Da es sich um ein Meerschweinchen, also um ein für Tuberkulose empfängliches Tier, handelte, ist es angebracht, diese Tatsachen auch auf den Menschen anzuwenden, wo Fälle latenter Tuberkulose aus Vernunftgründen angenommen werden müssen; sollten sie bei diesem experimentell erwiesen werden, wie ich sie beim Meerschweinchen feststellen konnte, so wird man, wenn nicht in allen Fällen, so doch in einem grossen Teile derselben, den Begriff des *tuberkulisierbaren Terrains* durch denjenigen eines mit *latenter Tuberkulose infizierten Terrains* ersetzen können.

SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Die Granula des Tuberkelbazillus sind von einer chromatinartigen Substanz gebildet.
2. Der Tuberkelbazillus muss als eine Vereinigung lebender Einheiten angesehen werden, welche durch die reproduktionsfähigen Granula repräsentiert werden.

- 3.º As granulações reprodutoras representam na tuberculose a mesma função que os conídios dos cogumelos.
- 4.º As granulações existentes no puz tuberculoso atravessam os filtros BERKEFELD (Modelo NORDMEYER).
- 5.º As granulações determinam na cobaia o início da reação tuberculijena.
- 6.º As granulações são constituídas, senão em totalidade, pelo menos em sua maior parte, por uma *paranucleo albumina*, analoga ou provavelmente identica a bacilo-caseína de AUCLAIR e PARIS.
- 7.º As granulações injetadas em cobaias produzem bacilos reveláveis por inoculação em serie.
- 8.º Nas culturas o virus da tuberculose evolve desde o estágio de granulação ao de grumos bacilares.
- 9.º O animal experimentado não revelou molestia durante cinco mezes; nelle foram encontrados bacilos de tuberculose sem lezões especificas maiores que infiltração linfocitaria

Agradecemos aos bons amigos e companheiros de trabalho Drs. CARLOS CHAGAS, GASPAR VIANNA e A. MACHADO o auxilio que nos prestaram e que nos foi sobremodo eficaz não só no estudo da citoljia do bacilo como no das lezões experimentais.

Já estava escrito e em provas o prezente trabalho quando tivemos conhecimento pelo Dr. ADOLPHO LUTZ de uma publicação que fizera em 1886 e que saiu inserta no primeiro faciculo dos «Dermatologische Studien, hrsg. v. Dr. P. G. UNNA soib o titulo «Zur Morphologie des Mikroorganismus der Lepra». Por esse trabalho se vê que já o Dr. LUTZ havia verificado o papel preponderante da gra-

3. Die reproduktionsfähigen Granula dienen bei der Tuberkulose derselben Funktion, wie die Conidien bei den Pilzen.
4. Die im tuberkulösen Eiter enthaltenen Granula gehen durch BERKEFELD'sche Filter (Modell von NORDMEYER) hindurch.
5. Die Granula bewirken bei Meerchweinchén den Beginn der tuberkelbildenden Reaktion.
6. Die Granula bestehen, wenn nicht ganz, so doch zum grössten Teile, aus einem Paranucleoalbumin, das dem Bacillocasein von AUCLAIR und PARIS analog und wahrscheinlich mit demselben identisch ist.
7. In Meerschwinchen injiziert, bringen die Granula Bazillen hervor, welche durch Ueberimpfung in Serien nachweisbar sind.
8. In den Kulturen entwickelt sich das Tuberkulosevirus vom Stadium des Granulums zu demjenigen der Bazillenklümpchen.
9. Das Versuchstier zeigte während neun Monaten keine Krankheit; es wurden in demselben Tuberkelbazillen gefunden, ohne grössere spezifische Veränderungen, als eine Leukozyteninfiltration.

Meinen Freunden und Mitarbeitern Drs. CARLOS CHAGAS, GASPAR VIANNA und A. MACHADO verdanke ich die mir geleistete Hilfe, welche mir besonders beim Studium der Zytologie des Bazillus und der experimentell erzeugten Veränderungen von Nutzen war.

Diese Arbeit war bereits druckfertig als ich von Dr. ADOLPH LUTZ von einer, von ihm im Jahre 1886 gemachten Publication, mittheilung erhielt; dieselbe erschien im ersten der von Dr. P. G. UNNA herausgegebenen Hefte «Dermatologische Studien» unter dem Titel «Zur Morphologie des Microorganismus der Lepra». Man sieht daraus, das Dr. LUTZ bereits die vorwiegende Rolle der Granulationen des Leprabazillus bei seiner Reproduktion fest-

nulação do bacilo da lepra na reprodução dele. Mostra a verificação feita por mim na tuberculose 24 anos depois do que LUTZ descreveu em relação á lepra (e tuberculose) ainda que com interpretação diversa do processo de reprodução, a justeza de nossas observações. E isso será tanto mais digno de nota quanto se pensar na dificuldade da tecnica do inicio da bacteriologia, *maxime* em verificações desta natureza.

Manguinhos, Março — 1910.

EXPLICACÃO DAS ESTAMPAS

16 e 17.

- Fig. 1. Preparação de cultura homojenca antiga. Fixação a humido pelo sublimado-alcool; coloração pelo metodo FONTES.
- Fig. 2 & 2a. Preparações de culturas homojeneas, fixadas a humido e coradas pela hematoxilina DELAFIELD.
- Fig. 3. Preparação de cultura homojenea, fixada a humido; coloração pela hematoxilina DELAFIELD.
- Fig. 3a. Preparação de escarro tuberculoso, fixado a humido e corado pelo metodo FONTES.
- Fig. 4 & 5. Preparações de culturas homojeneas. — Fixação a humido e coloração pela hematoxilina DELAFIELD.
- Fig. 6. Escarro tuberculoso fixado a humido e corado pelo metodo FONTES.
- Fig. 7, 7a e 7b. Preparações de culturas homojeneas. — Fixação a humido. — Coloração pela hematoxilina DELAFIELD.
- Fig. 8. Fragmento de cultura em pele. — Fixação a humido; coloração pelo metodo FONTES.
- Fig. 9. Preparação de cultura homojenea. Fixação a humido. — Coloração pela hematoxilina DELAFIELD.
- Fig. 10 e 11. Fragmentos de cultura em pele. — Fixação a humido; coloração pelo metodo FONTES.
- Fig. 12, 12a e 12b. Preparação de puz cazeozo de cobraia. — Fixação a humido. — Coloração pela hematoxilina DELAFIELD.

gestellt hatte. Die von mir bei der Tuberculose gemachte Konstatierung desjenigen, was LUTZ vor 24 Jahren für die Lepra und Tuberculose beschrieb (wenn auch mit einer anderen Auffassung des Reproduktionsprozesses), spricht für die Richtigkeit unserer Beobachtungen. Es ist dies um so merkwürdiger, wenn man die technischen Schwierigkeiten zu Anfang der Bakteriologie in Rechnung zieht, besonders bei Feststellungen dieser Art.

Manguinhos, März — 1910.

ERKLAERUNG DER TAFELN

16 u. 17.

- Fig. 1. Präparat von älterer homogener Kultur. Feuchte Fixierung mit Sublimat-Alkohol; Färbung nach FONTES.
- Fig. 2 & 2a. Präparat von homogener Kultur, feucht fixiert und mit Hämatoxylin nach DELAFIELD gefärbt.
- Fig. 3. Ebenso.
- Fig. 3a. Präparat aus tuberculösem Sputum; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.
- Fig. 4—5. Präparate von homogener Kultur; feucht fixiert und nach DELAFIELD mit Hämatoxylin gefärbt.
- Fig. 6. Präparat aus tuberculösen Sputum; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.
- Fig. 7, 7a, 7b. Präparate von homogener Kultur. Feuchte Fixierung und Färbung nach DELAFIELD.
- Fig. 8. Fragment aus der in einer Kultur gebildeten Haut; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.
- Fig. 9. Präparat von homogener Kultur; feuchte Fixierung und Färbung nach DELAFIELD.
- Fig. 10—11. Fragmente aus Hautkulturen; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.
- Fig. 12, 12a, 12b. Präparat aus dem käsigen Eiter eines Meerschweinchens. Feuchte Fixierung und Färbung nach DELAFIELD.

- Fig. 12c. Escarro tuberculoso. — Fixação a humido. — Coloração pelo metodo FONTES.
e 12d.
- Fig. 13. Corte de baço. — Metodo FONTES. — Fotomicrografia.
- Fig. 14. Bacilo-cazeina antes da ação do fosfato de sodio. — GRAM-FUCSINA diluida.
- Fig. 15. Bacilo-cazeina depois da ação do fosfato neutro de sodio. — GRAM-FUCSINA diluida.
- Fig. 16. Bacilos de tuberculoze corados pelo GRAM-FUCSINA diluida.
- Fig. 17. Corte de ganglio — ZIEHL acido azotico ao terço e hematoxilina.
- Fig. 18. Corte de pulmão. — Methodo FONTES.
- Fig. 12c. Tuberculöses Sputum; feuchte Fixierung und Färbung nach FONTES.
& 12d.
- Fig. 13. Milzschnitt nach FONTES gefärbt. Photomikrographie.
- Fig. 14. Bazillocasein vor der Einwirkung des basisch phosphorsauren Natrons. GRAM, verdünnte Fuchsinlösung.
- Fig. 15. Bazillocasein nach der Einwirkung des basisch phosphorsauren Natrons. GRAM, verdünnte Fuchsinlösung.
- Fig. 16. Tuberkelbazillen nach GRAM und mit verdünnter Fuchsinlösung gefärbt.
- Fig. 17. Lymphdrüsenschnitt. ZIEHL, Salpetersäure 1:2 und Hämatoxylin.
- Fig. 18. Lungenschnitt. Färbung nach FONTES.
-

